

私立中山醫學大學生物化學研究所
Graduate Institute of Biochemistry
Chung-Shan Medical University

碩士論文
Master Thesis

人類精蟲去氧核醣核酸受損
與粒線體完整性之研究
**Study of nuclear DNA damage
and mitochondrial integrity
in human spermatozoa**

指導教授：

林培正(David Pei-Cheng Lin)博士
朱嘉一(Chia-Yih Chu)碩士

研究生：

曹惠美 (Hui-Mei Tsao)

中華民國九十一年一月

誌 謝

生物醫學的溯溪之旅，越來越接近生命的起源。精蟲與卵子浪漫相遇後，一個新生命就此開始。老祖宗們說"三歲定終生"，然而，人的才智，個性，甚至疾病，可能在出生之前就決定了。以前我們認為，除了遺傳疾病之外的疾病都是後天得到的，事實上，越來越多的證據顯示，許多複雜性疾病都有其遺傳和發育的因緣。如果說，基因密碼決定一個人的七情六慾，那麼對於芸芸眾生的貪，瞋，痴，應更能諒解與釋懷吧。

在二十一世紀的破曉，對一個從事生殖醫學研究的我來說，想感謝不孕症患者提供實驗材料以及前輩先進的提攜教導還有朋友同好的互相勉勵。生命的奧秘如此多嬌，引無數英雄競折腰。一路走來儘管有困頓有失落，希望自己執迷不悔。

最後願將此論文獻給我親愛的父母以及關心我的每一個人。

目 錄

	頁次
表次 圖次 -----	5
附錄說明 -----	6
縮寫表 -----	7
一、 中文摘要 -----	8
二、 英文摘要 -----	9
三、 緒論 -----	10
四、 材料與方法 -----	14
五、 結果 -----	24
六、 討論 -----	36
七、 參考文獻 -----	44
八、 附錄 -----	63

表次

表一	精液分析結果與精蟲去氧核醣核酸片段化 發生率之比較 -----	27
表二	精液分析結果與粒線體功能缺陷發生率之比較 --	29
表三	精液分析結果與精蟲染色體倍數異常發生 率之比較 -----	31
表四	生長停滯胚胎螢光原位雜交法分析結果 -----	33
表五	比較精液異常以精蟲顯微注射術(ICSI)治療和非 男性因素試管嬰兒(IVF)治療的病人之臨床結果 -	35

圖次

圖一	人類精蟲在經過 Percoll 梯度離心後以 TUNEL 方法分 析去氧核醣核酸片段化情形 -----	28
圖二	人類精蟲在經過 Percoll 梯度離心後以 JC-1 分析粒線 體功能缺陷情形 -----	30
圖三	人類精蟲在經過 Percoll 梯度離心後以螢光原位雜交 法(FISH)分析染色體倍數情形 -----	32
圖四	透過螢光原位雜交法(FISH)在螢光顯微鏡下觀察生長 停滯胚胎染色體倍數 -----	34

附錄說明

	頁次
附錄一 試管嬰兒懷孕及分娩 2612 名新生兒之結果 分析-2201 案例 -----	63
附錄二 以精蟲顯微注射治療 2196 個男性不孕症療 程之結果分析 -----	64
附錄三 精蟲顯微注射術產生之男嬰與其不孕父親之 Y 染色體缺損遺傳之可能性 -----	65
附錄四 Y 染色體微缺損之病患施行精蟲顯微注射術 後之結果 -----	66
附錄五 精液分析之計算盤 -----	67
附錄六 人類輸卵管培養液之配製 -----	68

縮寫表

DAPI: 4,6-diamino-2-phenylindole

dUTP-nick end labeling

FISH: fluorescent *in situ* hybridization

HTF medium: human tubal fluid medium

ICSI: intracytoplasmic sperm injection

IVF: *in vitro* fertilization

OAT: oligoathenoteratozoospermia

PBS: phosphate buffered saline

PVP: polyvinylpyrrolidone

TdT enzyme: terminal deoxynucleotidyl transferase

TRITON X-100: t-octylphenoxypolyethoxyethanol

TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)-mediated

Tween 20: polyoxyethylenesorbitan monolaurate

中文摘要

具有完整去氧核醣核酸的精蟲才能傳遞正確的遺傳訊息給下一代，而受精成功是生命誕生的第一步。本篇試驗目的是要鑑定精蟲去氧核醣核酸片段化、粒線體功能缺陷與染色體倍數異常之發生率在臨床上精液分析結果與受精率之間作相關性比較。試驗結果發現精蟲異常病患有較高之精蟲去氧核醣核酸片段化發生率(18.8% vs. 2.8%)，粒線體功能缺陷發生率(24.9% vs. 5.7%)與染色體倍數異常發生率(0.12% vs. 0.06%)，且其受精率(67.1%)亦比非男性因素試管嬰兒(IVF)治療的病人之受精率(85.5%)低。因此在施行精蟲顯微注射術之前，遺傳諮詢及如何篩選品質優良精蟲就成為重要課題。

Abstract

Sperm DNA integrity is essential for accurate transmission of genetic material to offsprings. Fertilization marks the creation of a new and unique individual. The aim of this study was to determine the incidence of sperm nuclear DNA fragmentation, mitochondrial dysfunction and chromosomal aneuploidy, and to correlate these results with semen analysis parameters and fertilization rates. The sperm DNA fragmentation rate (18.8%), mitochondria dysfunction rate (24.9%) and chromosomal aneuploidy rate (0.12%) of oligoathenoteratozoospermic patients are significantly higher than those of the normozoospermic patients. The fertilization rates in intracytoplasmic sperm injection (ICSI; 67.1%) of oligoathenoteratozoospermic patients are significantly less than in cases of *in vitro* fertilization (IVF; 85.5%). The result indicates that spermatozoa from oligoathenoteratozoospermic patients contain higher portions of DNA fragmentation, mitochondrial dysfunction and chromosomal aneuploidy. Since extremely poor semen samples are the indication for ICSI, the selection of good quality sperm for oocyte injection is very important.

緒 論

世界衛生組織估計，大約有 10~15% 的夫婦經歷過不孕的問題，然而不孕症的盛行率在不同的區域也有分別，在台灣地區約 5~6 對夫婦就有一對是不孕的，而人工協助生殖技術已成目前治療不孕症，克服生殖障礙的治療利器。體外受精 (IVF; *in vitro* fertilization) 及精蟲顯微注射術 (ICSI; intracytoplasmic sperm injection) 已經被全世界各大生殖醫療中心廣泛的用於治療部份的不孕症患者。但是，施行人工生殖技術非常昂貴，而且對人體為侵入性治療，有時候對婦女身體是一種傷害，因此如何提高人工生殖技術的成功率就非常重要。

精蟲分析與功能評估

精蟲品質在人類生殖領域中扮演非常重要的角色，臨床上主要是以電腦輔助分析系統來分析精蟲的濃度、活動性及形態。在所有不孕症的原因中，受檢的不孕夫妻裡，男性不孕症約佔百分之三十，其異常可分為精液的異常與性功能障礙。依據世界衛生組織在 1992 年所訂的標準，正常精液 (normozoospermia) 的量至少有兩毫升；精蟲濃度至少每毫升兩千萬；在射精後一小時內至少有百分之五十的精蟲呈直線前進之活力，或至少有百分之二十五呈快速前進之精蟲；且至少有百分之三十的精蟲形態正常；另至少有百分之七十五以上為活的精蟲；精液中白血球少於每毫升一百萬個。除了從外觀評估精蟲品質之外，還有以低滲透壓膨脹法 (hypoosmotic swelling test) 評估精蟲細胞膜的完整性 (Jeyendran *et al.*, 1984) 和半卵子透明帶法 (hemizona assay) 評

估精蟲受精能力(Coddington *et al.*, 1994)。雖然傳統精液分析方法頗具參考價值，但是在預測受精率和懷孕率等臨床結果上卻很有限，仍需要找出適合的輔助方法去評估精蟲品質。本試驗乃試著從分子層面去分析精蟲，以期能更精確評估精蟲品質。

受精失敗形態分析

試管嬰兒療程中，造成受精失敗的形態包括：精蟲穿入卵子失敗(55.5%)，卵子激活失敗(15.1%)，原核就位缺陷(19.2%)；而在精蟲顯微注射術療程中，造成受精失敗的形態則包括：卵子激活不全(39.9%)，原核就位缺陷(22.6%)，精蟲穿入卵子失敗(13.3%)，細胞週期停滯於第一次有絲分裂細胞間期(13.3%)。造成精蟲顯微注射術受精失敗的原因包括：穿入的精蟲無法啟動卵子激活所需的生化反應，卵子激活所需的生化反應執行不完全，精蟲染色質無法解緻密化，使卵子因子無法誘導雄原核發展及顯微注射的過程可能使卵子有微細的傷害(Rawe *et al.*,2000)。除此之外，精蟲顯微注射術療程的受精率一般都低於試管嬰兒療程的受精率，這可能和精蟲品質不佳的病人通常都需施行精蟲顯微注射術有關。

精蟲顯微注射術的遺傳考量

從 1992 年發表施行精蟲顯微注射術成功懷孕至今，精蟲顯微注射術確實幫助了很多嚴重的男性不孕症患者(Palermo *et al.*,1992)，例如：精蟲稀少症(oligozoospermia)、無精症(azoospermia)、精蟲活動力不足(asthenozoospermia)和精蟲形

狀異常(teratozoospermia).等。然而以精蟲顯微注射術治療男性不孕症，對未來人類族群的遺傳組成會有負面影響(Cummins *et al.*, 1994;Bhasin *et al.*, 1994)，因為精蟲顯微注射術略過了屬於人類生殖演化中精蟲選擇的生物機制，因此精蟲去氧核醣核酸的完整性特別重要，以確保傳遞正確的遺傳物質給下一代。具有完整去氧核醣核酸的精蟲，才能傳遞正確的遺傳訊息給下一代，去氧核醣核有缺損的人類精蟲，透過精蟲顯微注射術，可使卵子形成雙原核(Twigg *et al.*, 1998)，因此受精作用對去氧核醣核酸有缺損的人類精蟲並不是屏障，也指出精蟲去氧核醣核酸的問題會導致下一代的基因異常。

精蟲去氧核醣核酸的片段化

細胞核內去氧核醣核酸的片段化是細胞凋亡的指標之一，且細胞凋亡是真核生物細胞死亡最常見的型式。細胞凋亡發生在正常的生理現象中，主要特徵為細胞萎縮，細胞膜崩散，磷脂絲氨酸(phosphatidylserine)外排，染色質聚集與片段化(Wyllie *et al.*, 1980; Earnshaw, 1995; Martin *et al.*, 1995)。此過程有一特徵為內生性內核 (endonuclease)活化，導致去氧核醣核酸的片段化(Wyllic *et al.*, 1980; Arends *et al.*, 1990; Compton, 1992)。細胞凋亡不同於壞死現象，在細胞瓦解扮演主動角色。其具備特有的微細結構特徵(Kerr *et al.*, 1972; Wyllie *et al.*, 1980)與生化變化(Wyllie, 1980; Williams and Smith, 1993)，且是由精確的基因與分子引發的反應(Williams, 1991; Boise *et al.*, 1993; Oltvai *et al.*, 1993; Williams and Smith, 1993)。

人類精蟲並無轉錄與轉譯作用發生，因此精蟲細胞凋亡現象有兩種假說被提出(Sakkas *et al.*, 1999b)，有一派理論認為，內生性內核 活性缺陷導致雙股去氧核糖核酸有缺口，是造成去氧核糖核酸的片段化的主因(McPherson and Longo, 1992, 1993a.b; Sakkas *et al.*, 1995)。另一派理論認為，精蟲細胞凋亡現象是由細胞表面蛋白 Fas 所媒介的(Suda *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1997)。在睪丸中精蟲生成過程裡，會發生由細胞凋亡現象導致的去氧核糖核酸受損，在精原母細胞 (spermatogonia)和分裂中的細胞特別明顯(Lee *et al.*, 1997; Tesarik *et al.*, 1998; Yin *et al.*, 1998; Host *et al.*, 1999; Pentikainen *et al.*, 1999; Sakkas *et al.*, 1999a; Print and Loveland, 2000)。精蟲細胞凋亡比例增加和生殖道感染，癌症..等有關(Baccetti *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 1999; Gandini *et al.*, 2000)，過氧化物(Reactive oxygen species)會導致體細胞凋亡，亦有可能造成精蟲細胞凋亡。放射線會造成精蟲染色體異常(Tateno *et al.*, 1996)和去氧核糖核酸受損(Haines *et al.*, 1998)。一般而言，在精蟲生成過程中，會有一半以上的細胞在成熟之前以細胞凋亡方式死亡，以去除過剩或基因異常細胞。如果此過程發生錯誤，則會影響射出的精液量和品質。

精蟲粒線體膜電位改變

精蟲跟卵子一樣，也含有粒線體，只是屬於精蟲的粒線體在受精後會很快的被降解掉。相較於卵子含有十萬個粒線體，一般精蟲只含有 50~100 個粒線體，如果不正常或不成熟精蟲被以顯微注射方式打入卵子，屬於精蟲的粒線體可能無法被適當降解，而進一步影響胚胎發育。而且，有一些細

胞凋亡現象是由粒線體開始的(Zamzami *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1996; Petit *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1997), 粒線體位於精蟲中節, 主要是提供給精蟲鞭毛推進的能量。粒線體參與的細胞凋亡現象有許多不同機制(Zhuang *et al.*, 1998a; Dinsdale *et al.*, 1999; Finucane *et al.*, 1999)。包括半胱胺酸蛋白水解(cysteine protease)的活化, 也就是所謂的 caspase, 使細胞呼吸色素 c 從粒線體釋放而影響電子傳遞鏈, 氧化磷酸化和 ATP 合成(Green and Reed, 1998)。其他機制包括失去粒線體膜電位; 細胞氧化還原能力的變異; 參與細胞凋亡前家族蛋白和抗細胞凋亡家族蛋白(例如 Bcl-2)之反應。雖然細胞凋亡並不依賴氧化磷酸化反應或粒線體去氧核糖核酸(Jacobson *et al.*, 1993), 粒線體被證實在很多細胞系統為細胞凋亡合作任命者(Frade and Michaelidis, 1997; Kroemer, 1997; Zhuang *et al.*, 1998b; Green and Reed, 1998)。

檢驗細胞凋亡方法

體細胞的細胞凋亡可經由電泳產生階梯形態判定去氧核糖核酸片段化(Wyllie *et al.*, 1980), 然而精蟲含有原胺類(protamine)不適用此方法。其他方法還有原位末端標示法(*In situ* end labeling)去檢測雙股去氧核糖核酸缺口(nick)(Gavrieli *et al.*, 1992; Wijsman *et al.*, 1993; Nishikawa and Sasaki, 1995) TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)-mediated dUTP-nick end labeling)就是其中一個方法。另外還有彗星法(comet assay; single cell gel electrophoresis), 可同時檢測單股與雙股去氧核糖核酸斷裂。

精蟲染色體異常

臨床精液分析精蟲濃度，活動力與形態，以建立精液品質參數已經行之有年，且確定精蟲品質在人類生殖扮演之重要角色。精液製備技術，例如：上游法(*swim-up technique*)和Percoll梯度離新法(*Percoll gradient centrifugation*)在分離活的精蟲以提高精液品質(*Ben-Chetrit et al., 1995*)對試管嬰兒和精蟲顯微注射術之應用亦有很大貢獻。選取活的且形態正常的精蟲對精蟲顯微注射術之應用尤其重要，因為精蟲顯微注射術略過了屬於人類生殖演化中精蟲選擇的生物機制，低滲透壓膨脹法(*hypo-osmotic swelling test*)可以檢測活的但不動的精蟲(*Casper et al., 1996*)，對精蟲顯微注射術中，活動力0%的個案之精蟲選取很有幫助。但是，在施行試管嬰兒所誕生的寶寶中並無明顯染色體異常率增加，而在施行精蟲顯微注射術所誕生的寶寶中，其性染色體異常率卻偏高(*In't Veld et al., 1995*)，這可能和男不孕症病人染色體異常率(*Jaffe et al., 1994*)和隱性基因異常率(*Patrizio et al., 1993; Oates et al., 1994*)偏高有關。經由精蟲顯微注射術懷孕的胎兒產前檢查發現有約1%的性染色體異常率(*Liebaers et al., 1995*)，且被認為此染色體異常乃由父系來的(*Van Opstal et al., 1997*)。

人類精蟲染色體異常之檢測曾以去透明帶的倉鼠卵穿刺法分析(*Rudak et al., 1978; Martin et al., 1982*)，然而此法較耗時且昂貴，分析的精蟲數有限。最近有一些報告是以螢光原位雜交法分析精蟲染色體倍數異常率，這是一個具有高敏感度和專一性的方法，而且可分析大量精蟲數。但其缺點為此技術只能應用在細胞間期，染色體結構異常無法檢測，而且精蟲細胞核很小，同時能檢測的染色體數有限。

精蟲品質與懷孕率

傳統的精液分析法在預測懷孕上仍有瓶頸，而具有大於百分之三十或四十的精蟲去氧核醣核酸緻密化缺陷會使自然懷孕的機率降低(Evenson *et al.*, 1999; Spano *et al.*, 2000)，由 TUNEL 檢測不良的精蟲去氧核醣核酸比例偏高者，在體外其精蟲受精率亦偏低(Lopes *et al.*, 1998)，精蟲品質越差由 TUNEL 檢測不良的精蟲去氧核醣核酸比例亦越高(Hughes *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 1998; Irvine *et al.*, 2000)，因此在可自然受孕和不孕的男性中去評估精蟲去氧核醣核酸完整性就非常重要。另一方面，在人類精蟲染色體異常之研究曾發現，約有 8~12% 染色體 13，18 和 21 三套體所造成的流產是由父系來的(Nicolaidis and Petersen, 1998)。

論文試驗目的

本篇論文試驗目的是要鑑定精蟲去氧核醣核酸片段化、粒線體功能缺陷與染色體倍數異常之發生率和在臨床上精液分析參數與受精率之間作相關性之分析，以建立分子層面的精液品質評估方法。

材料與方法

一、 精液收集

從李茂盛婦產科收集了 20 個新鮮的精液樣本，其中 10 個為精液正常(精蟲濃度兩千萬 / 毫升以上；有活動力精蟲百分之五十以上，百分之十四以上的精蟲形態正常)，另十個為精液稀少伴隨活動力不足與形態異常(精蟲濃度兩千萬 / 毫升以下；且有活動力精蟲不到百分之五十，又百分之十四以下的精蟲形態正常)，需輔助以精蟲顯微注射術治療。使用收集精液之器皿，必須是廣口無橡膠且乾燥無污染的容器，因橡膠和水會殺死精蟲。適當的禁慾時間為至少四十八小時，但不超過七天，以手淫方式取得。

二、 精液製備

精液樣本在室溫下液化十至三十分鐘，使精液獲能 (capacitation)，有些存在有如膠狀之顆粒不會液化，而其是否有何意義尚不清楚，若六十分鐘後仍有粘液狀線絲，則表示液化不完全，會影響精蟲活動，有些精液不會自然液化，須以機械式攪拌，然後進行原始精液分析。之後將精蟲於人類輸卵管液培養液(HTF medium; human tubal fluid)中使用 Percoll 梯度離心法(80%~50% ; Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden)收集，如果此方法收集不到有活動力的精蟲，精液可應用人類輸卵管液培養液稀釋，350g 離心十分鐘，重複洗滌處理兩次。

三、 電腦輔助精液分析

精液中精蟲含量僅佔 1% 左右，其餘的成分叫精漿(semen plasma)，包括：儲精囊液約 2.5 毫升，前列腺液約 0.5 毫升與尿道球腺液約 0.2 毫升，Percoll 製備後之精液樣本，於光

學顯微鏡(Nikon)下以電腦輔助精液分析系統(Version 10.7; Hamilton-Thron Research, Beverly, MA, USA)分析精蟲濃度和活動力.等。根據世界衛生組織所訂的標準(WHO, 1999), 正常精蟲濃度至少每毫升兩千萬, 在射精後一小時內, 至少有百分之五十的精蟲呈直線前進之活力。

四、 精蟲形態評估

精蟲形態需在具有 1000 倍油鏡的光學顯微鏡下評估, 至少計數 100 隻精蟲, 至少百分之十四的精蟲形態為正常才列為正常, 否則為精蟲形態異常(teratozoospermia)。目前至少有六十種不同形態的精蟲被提出, 一般將精蟲形態的異常區分如下:

1. 頭部形狀或大小異常, 包括: 太大、太小、細長型、梨型、不規則型、空泡型或雙頭型。
2. 頸部及中段異常, 如斜頸、頸部或中段膨大、不規則、等。
3. 尾部異常, 包括: 尾部太短、不只一條、捲曲、斷裂、不規則或沒有尾巴等。
4. 細胞質顆粒大於正常精蟲頭部的三分之一以上, 一般細胞質顆粒位於頸部或精蟲中段的位子。

五、 **TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling)**檢測精蟲去氧核醣核酸片段化

Percoll 處理後之精液以 PBS(phosphate buffered saline; Sigma)洗一次, 離心收集精蟲, 再以 1%福馬林/PBS 於 4°C 下固定精蟲一小時, 然後將精蟲樣本噴於載玻片上, 使精蟲樣本風乾, 再將此玻片以 PBS 各五分鐘洗三次, 然後以 0.2%

Triton X-100(t-octylphenoxypolyethoxyethanol; Sigma)/PBS 處理十分鐘，使精蟲細胞膜通透化，染色體解緻密化，再將此玻片以 PBS 各五分鐘洗三次，以細胞凋亡偵測系統(Promega, USA)檢測之。其步驟為先以平衡緩衝液在室溫下處理 5 分鐘，再混合平衡緩衝液，fluorescein-12-dUTP 與核酸混合液及 TdT 酵素一起於 37°C 下反應一小時，然後以 2 倍 SSC 洗去非特異性結合，再將此玻片以 PBS 各五分鐘洗三次，加 DAPI(4,6-diamino-2-phenylindole)負染去氧核糖核酸，在螢光顯微鏡(Nikon)下呈綠色螢光之精蟲，即有去氧核糖核酸片段化之現象，因為雙股去氧核糖核酸中，如有單股缺陷即會被 TdT 酵素接上有綠色螢光之 dUTP，計數有去氧核糖核酸片段化之精蟲比例，且至少計數 500 隻精蟲。

六、 精蟲粒線體功能完整性之測試

以 Apoalert™ Mitochondrial Membrane Sensor Kit (MitoSensor:Clontech Laboratories Inc., USA)所含粒線體探針 5,5',6,6' -tetrachloro-1,1',3,3' -tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodide (JC-1)檢測精蟲粒線體膜電位之改變，此探針已被證實在完整細胞，可偵測出粒線體膜電位之改變 (Salvioli *et al.*, 1997)。精蟲粒線體膜電位大約為 250mV / 5~10nm，而 JC-1 在粒線體膜電位小於 100mV 時，會激發出綠色螢光(~525 nm)，大於 100mV 時，會激發出紅色螢光(~590 nm)。Percoll 處理後之精液，加於培養緩衝液培養於 5% 二氧化碳 37°C，40 分鐘；然後加入少量 MitoSensor 繼續培養 10 分鐘，在螢光顯微鏡下觀察呈綠色螢光(fluorescein)之精蟲，即為粒線體膜電位改變之精蟲，正常精蟲呈紅色螢光(rhodamine)。計數粒線體膜電位改變之精蟲比例，且至少計

數 500 隻精蟲。

七、 螢光原位雜交法(FISH, *Fluorescent in situ hybridization*)分析精蟲染色體倍數異常

將 Percoll 處理後之精液離心去上清液，以 PBS 洗三次再將精蟲以甲醇和醋酸 3 : 1 的固定液混合，噴於載玻片上，將玻片置於室溫下，使精蟲乾燥固定於玻片上，之後將玻片置於每毫升 0.1N 氫氧化鈉反應 10 分鐘，使精蟲去氧核糖核酸解緻密化，再用去離子水洗過，於 70%，90%，100% 酒精慢慢脫水，再於室溫下使玻片乾燥，然後進行螢光原位雜交法。螢光原位雜交的探針(Vysis)可於細胞間期偵測染色體倍數，包括以 CEP alpha satellite DNA 標定染色體 X(橘色)，satellite III DNA 標定染色體 Y (水藍色)，CEP alpha satellite DNA 標定染色體 18 (綠色)。將混色好的探針置於玻片上，蓋上蓋玻片，於 75°C 處理 4 分鐘使細胞核和探針的雙股去氧核糖核酸打開，再於 37°C 處理 5 分鐘作螢光原位雜交，之後以 60% formamide，兩倍 SSC 分別處理 42°C，2 分鐘，再用含 0.05% Tween 20(polyoxyethylenesorbitan monolaurate; Sigma)的四倍 SSC 室溫處理 2 分鐘，以洗去非特異性雜交，最後以 70%，90%，100% 酒精慢慢脫水，室溫下使玻片乾燥用 DAPI 作細胞核負染，於螢光顯微鏡下觀察染色體倍數，且至少計數 500 隻精蟲。

八、 誘導排卵

誘導排卵和卵子收集的執行乃根據 Yanagida 等於 1998 年之發表所敘述。卵子培養於人類輸卵管液培養液三至八小時。施行精蟲顯微注射術之前，於加入每毫升 0.2 毫克玻尿酸 (Type 8, H-3757, Sigma Chemical, St Louis, MO, USA)

的人類輸卵管液培養液中，藉由毛細管的吸放去除卵丘細胞(cumulus cell)，達到細胞中期二期(metaphase II)具有第一極體的卵子，則適合於施行精蟲顯微注射術。

九、 精蟲顯微注射術

精蟲顯微注射術的方法乃沿用Palermo 等人於1992年發表的方法，精蟲顯微注射針的內徑為六微米，而固定卵的微細管內徑為十五微米，取卵當天取精液於無菌的杯中，待液化後洗滌，並將濃度調整至 $2-3 \times 10^6/\text{ml}$ 備用。同時在顯微鏡下卵丘細胞卵子複合體，移入含80IU/ml 玻尿酸酵素(hyaluronidase; Sigma)的培養液中，用玻璃管吸放卵子，以除去附著的顆粒細胞，接著選擇含有第一極體的成熟卵子進行。首先小心的架設顯微注射器的固定吸管及微注射管至方便操做的角度，將預先處理好的精蟲放置於含有PVP 培養液中，周圍則僅放置培養液及成熟的卵子，在含有濃度百分之八的polyvinylpyrrolidone (PVP-360; Sigma) 人類輸卵管液培養液中，盡量選取有活動力且外型正常的精蟲，經由精蟲顯微注射微細管壓尾巴，以去精蟲活動力，再由尾端將精蟲吸入注射管內，接著用固定吸管吸住卵子，使第一極體維持在十二點或六點方向，注射針由三點鐘方向刺入，穿過透明層後開始吸細胞質，若發現細胞膜破時停止吸力，接著把吸出的細胞質及精蟲一併緩緩的注入細胞質中，慢慢抽出針，將卵子移回培養基中並放回培養箱繼續培養。

施行精蟲顯微注射術的條件如下：

1. 精蟲數目每毫升小於一千萬個細胞。
2. 精蟲活動力小於百分之二十。
3. 精蟲平均路徑速度小於每秒三十微米。

4. 精蟲平均前進速度小於每秒二十微米。
5. 精蟲正常形態小於百分之十四 (根據 Kruger's 嚴格條件, 1987)。
6. 精蟲存活率小於百分之五十。
7. 不明原因不孕大於或等於五年。
8. 於前一週期施行試管嬰兒後, 受精率低於百分之五十者。
9. 阻塞性或非阻塞性無精蟲症患者。

十、 胚胎發育品質的評估標準

卵子收集 (第零天) 受精後於第二天觀察胚胎發育情形。

胚胎品質評估標準：

- A 級：細胞分裂大小均勻，小碎片少於百分之十者。
- B 級：細胞分裂大小均勻，小碎片界於百分之十和百分之五十者。
- C 級：細胞分裂大小不均勻，小碎片少於百分之十者。
- C⁺ 級：細胞分裂大小不均勻，小碎片界於百分之十和百分之五十者。
- D 級：凡小碎片大於百分之五十者。

十一、 生長停滯胚胎螢光原位雜交法分析

將精蟲異常組，經過精蟲顯微注射術後生長停滯之胚胎 (n=8) 置於玻片上，在相位差顯微鏡下以每毫升 0.01N 鹽酸，含 1 微升 Tween 20，處理至細胞瓦解細胞核游離出，將玻片置於室溫 30 分鐘，使細胞核乾燥固定於玻片上，之後將玻片置於每毫升 0.01N 鹽酸，含 1 微克木瓜酵素處理 37°C，20 分鐘以移除蛋白質，再用去離子水洗過 70%，90%，100% 酒精慢慢脫水，室溫下使玻片乾燥，然後進行螢光原位雜交法。螢光原位雜交法的探針 (Vysis) 可於細胞間期偵測染色體倍數，包括以 CEP alpha satellite DNA 標定染色體 X (水藍色)，satellite III DNA 標定染色體 Y (綠色)，LSI locus-specific

DNA 標定染色體 21 (橘色)

十二、 統計精液異常病人，以精蟲顯微注射術治療和非男性因素試管嬰兒治療之臨床結果

從李茂盛婦產科病歷中，統計民國 90 年 1 月至民國 90 年 10 月之非男性因素試管嬰兒治療組(n=310)，男性因素精蟲顯微注射術治療組(n=285)，男性因素精蟲顯微注射術治療之嚴重精蟲異常(OAT; n=55)組及本次試驗分析之精蟲異常組(n=5; 10 個中有 5 個以精蟲顯微注射術治療)，統計資料包括：母方年紀、不孕期(天)、卵泡數、採卵數、成熟卵數、植入數、懷孕率(%)、受精率(%)及胚胎分裂率(%)。

十三、 統計分析

以 chi-square 分析精液異常組與精液正常組之精蟲去氧核糖核酸片段化發生率、粒線體功能缺陷發生率及染色體倍數異常發生率是否有顯著差異。精液異常病人以精蟲顯微注射術治療之受精率和非男性因素試管嬰兒治療病人之受精率、胚胎分裂率和懷孕率則也以 chi-square 分析是否有顯著差異， $p < 0.05$ 則認定為有明顯差異。

結 果

一、 精液分析結果與精蟲去氧核醣核酸片段化發生率之比較

本試驗發現了可能為細胞凋亡程序的精蟲去氧核醣核酸片段化，可由 TUNEL 方法檢測。在螢光顯微鏡下，激發出之綠色螢光越強之精蟲，其去氧核醣核酸片段化的情形越嚴重。精液異常組之精蟲去氧核醣核酸片段化發生率(18.8%)明顯高於精液正常組(2.8%)($p < 0.05$; 表一，圖一)，這個結果可能是因為，精液異常組是以細胞凋亡的形式移除基因異常的精蟲，因此精蟲去氧核醣核酸片段化情形越嚴重，在射出的精液中，精蟲數目應會嚴重減少，而在臨床上，精蟲數目不足是會影響受精率的。由射出的精液中，還檢測得到去氧核醣核酸片段化來看，可知細胞凋亡程序在精液射出後，還有部份未完成。雖然精蟲可被檢測出去氧核醣核酸片段化，但卻沒有發現像體細胞一樣，會進一步造成去氧核醣核酸碎片化成約 200 個鹼基的情形。

二、 精液分析結果與粒線體功能缺陷發生率之比較

本試驗發現了也可能為細胞凋亡程序的粒線體膜電位降低，可由 JC-1 檢測。在螢光顯微鏡下，JC-1 激發出之紅色螢光越強之精蟲，其粒線體膜電位越強，或者有功能的粒線體倍數越多。精液異常組之粒線體功能缺陷發生率(24.9%)明顯高於精液正常組(5.7%)($p < 0.05$; 表二，圖二)，而粒線體主要是提供精蟲活動之能量，因此，在精液正常組射出的精液中，精蟲活動力應會嚴重減弱，而在臨床上，活動力不足會影響受精率。而且在精液異常組之粒線體功能缺陷發生率(24.9%)，也高於去氧核醣核酸片段化發生率(18.8%)，確認

了細胞凋亡程序是先由粒線體膜電位降低，然後才是在去氧核糖核酸階段的片段化。粒線體製造 ATP 是需要細胞核去氧核糖核酸幫助的，因此本試驗相信，粒線體功能缺陷發生率和去氧核糖核酸片段化發生率有關聯。

三、 精液分析結果與精蟲染色體倍數異常發生率之比較

以螢光原位雜交法分析精蟲染色體倍數異常，是一個快速且可分析大量精蟲數的方法。精液異常組之精蟲染色體倍數異常形態分別為 XY18(n=5)及 XY1818(n=1)，而精液正常組則為 XY18(n=3)(表三)。本試驗發現，精液異常組之精蟲染色體倍數異常發生率(0.12%)明顯高於精液正常組(0.06%)($p < 0.05$; 表三，圖三)，而染色體倍數增加，往往會造成屬於異常的大頭精蟲，同樣的，染色體倍數減少，則可能使精蟲呈現屬於異常的小頭精蟲，因此，精液異常組之精蟲染色體倍數異常和精蟲形態，應該最有關聯。另一方面，精蟲形態異常可能會影響精蟲直線前進的速度，對受精率應有影響。既然細胞凋亡程序會移除異常的精蟲，那麼精蟲染色體倍數異常應該和粒線體功能缺陷發生率及去氧核糖核酸片段化發生率有關。

四、 生長停滯胚胎螢光原位雜交法分析結果

精液異常組中有八個生長停滯胚胎做螢光原位雜交法分析，兩個胚胎染色體倍數正常，染色體倍數形態皆為 XY2121，另外六個則混合正常與異常染色體倍數的細胞(表四，圖四)，即所謂的 mosaic 情形。因為胚胎細胞是屬於快速分裂生長的細胞，發生染色體倍數異常偏高是可以理解的。而且生長停滯胚胎的品質通常不佳，分析的八個胚胎中，就有四個屬於 C⁺等級，胚胎中小碎片的產生，被認為是

細胞凋亡現象，因此染色體倍數異常和胚胎品質應有相關。

五、 比較精液異常病人以精蟲顯微注射術治療和非男性因素試管嬰兒治療之臨床結果

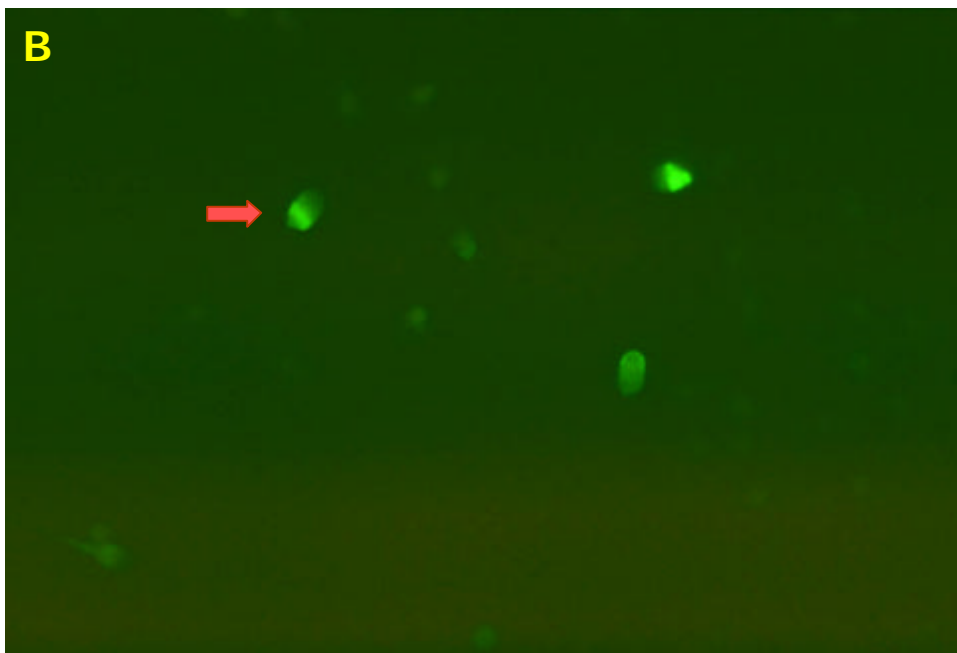
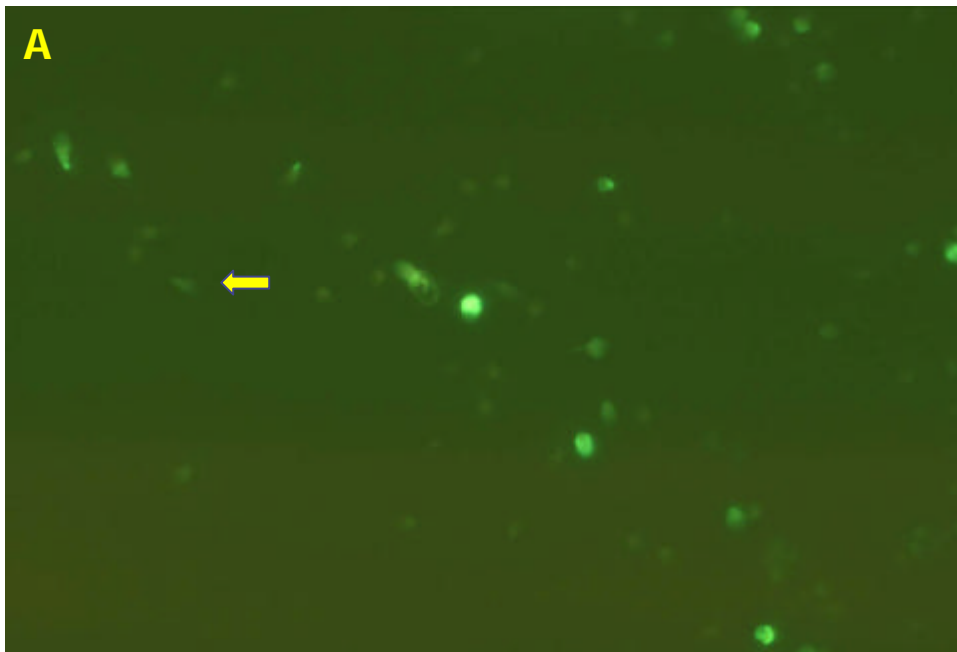
在臨床上，統計民國 90 年 1 月至民國 90 年 10 月之非男性因素試管嬰兒治療組(n=310)中發現，試管嬰兒治療之受精率為 85.5%，胚胎分裂率為 95.3%，懷孕率為 57.2%；而男性因素精蟲顯微注射術治療組(n=285)之受精率為 73.8%，胚胎分裂率為 90.1%，懷孕率為 44.2%。在男性因素精蟲顯微注射術治療組中之精液嚴重異常病人(OAT)有 55 個個案(19.30%; 55 / 285)，統計其受精率(67.1%)發現明顯低於非男性因素試管嬰兒治療病人之受精率(85.5%)($p < 0.05$; 表五)。屬於實驗組的精液異常組中，一共施行了五回合精蟲顯微注射術治療，其受精率(68.4%)亦低於非男性因素試管嬰兒治療病人之受精率(85.5%)，但懷孕率則無影響，這可能和臨床上誘導採卵數(25.0 ± 11.3)高於非男性因素試管嬰兒治療組(15.6 ± 10.2)有關，雖然胚胎分裂率較差(77.8% vs. 95.3%)，但植入之胚胎數沒有偏低。

表一 精液分析結果與精蟲去氧核醣核酸片段化發生率之比較

	精液正常組	精液異常組
病人數	10	10
病人年紀	36.4±4.5	32.1±2.4
精液體積(毫升)	3.0±2.6	3.2±1.5
禁慾天數(天)	5.0±4.0	4.4±1.8
精蟲濃度(10^6 /毫升)	74.2±33.0	8.0±7.10
精蟲活動力(%)	72.4±13.5	22.5±15.8
精蟲形態正常(%)	36.2±7.6	2.9±2.8
精蟲 DNA 受損數 / 計數精蟲數	141 / 5031	942 / 5012
精蟲 DNA 受損率(%)	2.8*	18.8*

*精液正常組和精液異常組之精蟲DNA受損率比較有明顯差異($p < 0.05$; Chi-square test)

圖一 人類精蟲在經過Percoll梯度離心後以TUNEL方法分析去氧核醣核酸片段化情形- A)此為精液正常組結果，此個案有1.6%DNA片段化情形，黃箭頭指出沒有呈綠色螢光之精蟲為去氧核醣核完整者(X400) B)此為精液異常組結果，此個案有23.3%DNA片段化情形，紅箭頭指出呈綠色螢光之精蟲為去氧核醣核酸片段化者(X600)

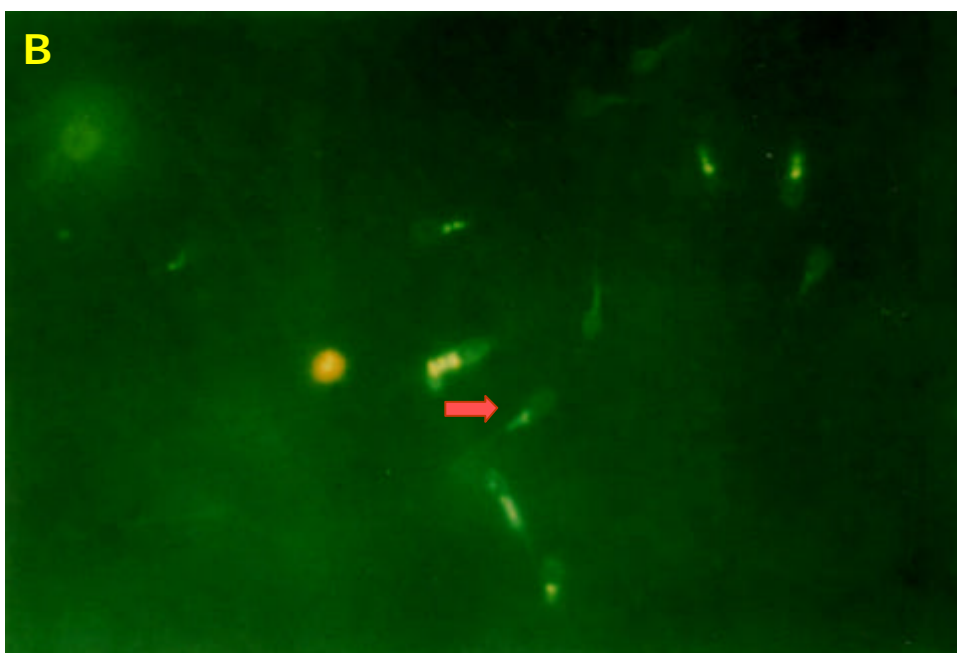
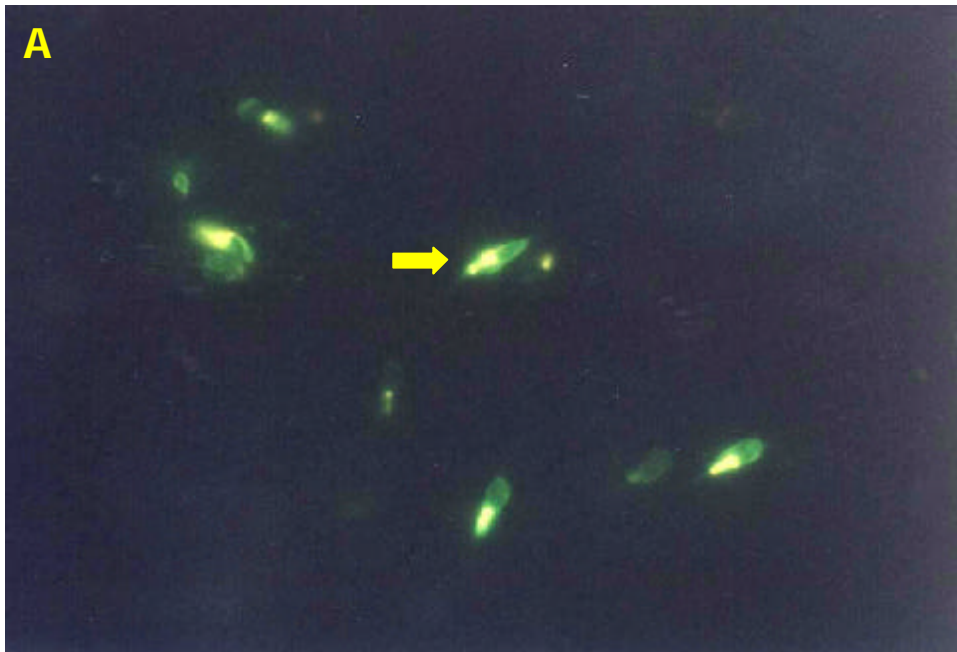


表二 精液分析結果與粒線體功能缺陷發生率之比較

	精液正常組	精液異常組
病人數	10	10
病人年紀	36.4±4.5	32.1±2.4
精液體積(毫升)	3.0±2.6	3.2±1.5
禁慾天數(天)	5.0±4.0	4.4±1.8
精蟲濃度(10^6 /毫升)	74.2±33.0	8.0±7.10
精蟲活動力(%)	72.4±13.5	22.5±15.8
精蟲形態正常(%)	36.2±7.6	2.9±2.8
精蟲粒線體 功能缺陷數 / 計數精蟲數	292 / 5121	1264 / 5077
精蟲粒線體 功能缺陷發生率(%)	5.7*	24.9*

*精液正常組和精液異常組之精蟲粒線體功能缺陷發生率比較有明顯差異($p < 0.05$; Chi-square test)

圖二 人類精蟲在經過 Percoll 梯度離心後以 JC-1 分析粒線體功能缺陷情形- A)此為精液正常組結果，此個案有 6.7% 粒線體功能缺陷情形，黃箭頭指出中節呈紅色螢光之精蟲即為粒線體膜電位正常之精蟲(X600) B)此為精液異常組結果，此個案有 36.5% 粒線體功能缺陷情形，紅箭頭指出中節呈綠色螢光之精蟲即為粒線體膜電位改變之精蟲(X600)

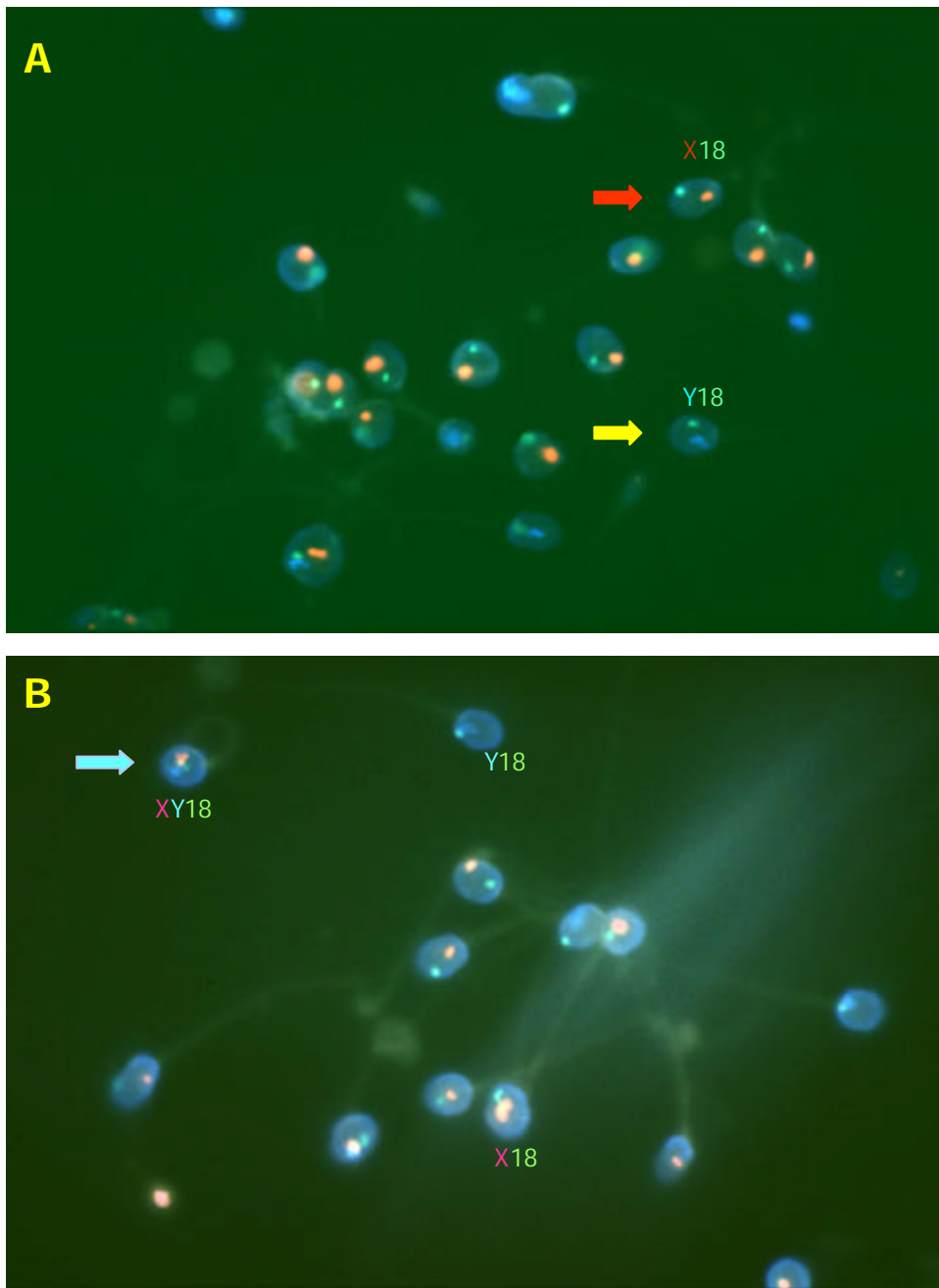


表三 精液分析結果與精蟲染色體倍數異常發生率之比較

	精液正常組	精液異常組
病人數	10	10
病人年紀	36.4±4.5	32.1±2.4
精液體積(毫升)	3.0±2.6	3.2±1.5
禁慾天數(天)	5.0±4.0	4.4±1.8
精蟲濃度(10^6 /毫升)	74.2±33.0	8.0±7.1
精蟲活動力(%)	72.4±13.5	22.5±15.8
精蟲形態正常(%)	36.2±7.6	2.9±2.8
精蟲染色體 倍數異常數 / 計數精蟲數	3 / 5023	6 / 5012
精蟲染色體 倍數異常形態	XY18(n=3)	XY18(n=5) XY1818(n=1)
精蟲染色體 倍數異常發生率(%)	0.06*	0.12*

*精液正常組和精液異常組之精蟲染色體倍數異常發生率比較有明顯差異($p < 0.05$; Chi-square test)

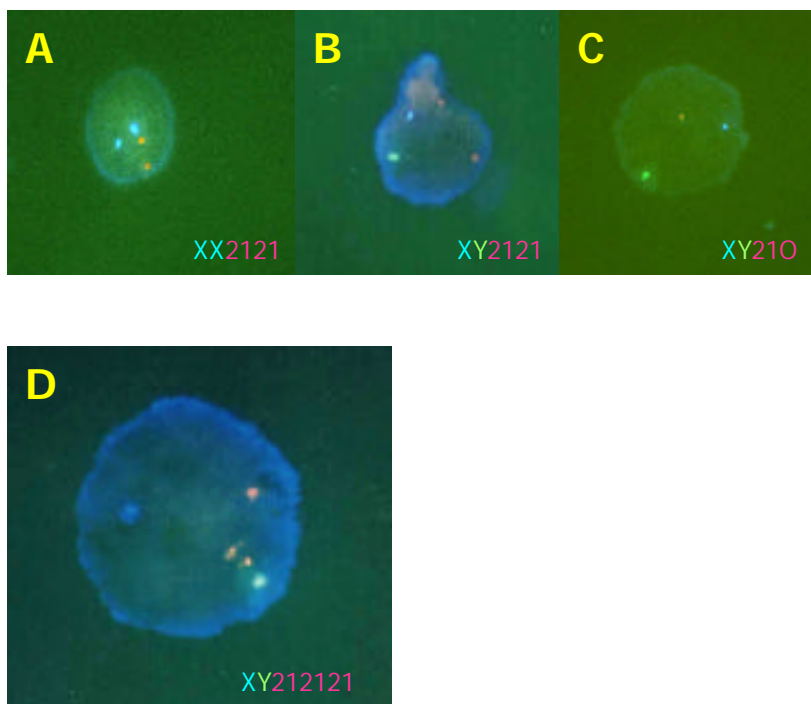
圖三 人類精蟲在經過 Percoll 梯度離心後以螢光原位雜交法(FISH)分析染色體倍數情形：染色體 X (橘色), 染色體 Y (水藍色), 染色體 18 (綠色) - A)紅箭頭指出判讀為正常的 X18 精蟲, 黃箭頭指出判讀為正常的 Y18 精蟲 (X1000) B) 藍箭頭指出判讀為異常的 XY18 精蟲(X1000)



表四 生長停滯胚胎螢光原位雜交法分析結果-胚胎號碼 4, 7
判讀為正常的 XY2121 胚胎，其餘的胚胎皆為 mosaic 情形

胚胎號碼	胚胎品質 與細胞數	固定核數	FISH 結果
1	5C	5	XX2121(n=3) XX21O(n=1) XO21O(n=1)
2	7C ⁺	6	XY2121(n=4) XY212121(n=1) XOOO(n=1)
3	5C ⁺	5	XX2121(n=2) XXXX21212121(n=1) XO21O(n=2)
4	4B	4	XY2121(n=4)
5	6C	6	XX2121(n=3) XXOO(n=1) XO21O(N=2)
6	4C ⁺	5	XY2121(n=2) XY21O(n=2) XYOO(N=1)
7	4C	4	XY2121(n=4)
8	4C ⁺	3	XX2121(n=1) XO21O(n=2)
總數	39	38	

圖四 透過螢光原位雜交法(FISH)在螢光顯微鏡下觀察生長停滯胚胎染色體倍數：染色體 X (水藍色), 染色體 Y (綠色), 染色體 21 (橘色) - A)判讀為正常的 XX2121 胚葉細胞 (blastomere)(X600) B)判讀為正常的 XY2121 胚葉細胞(X600) C)判讀為異常的 XY210 胚葉細胞(X600) D)判讀為異常的 XY212121 胚葉細胞(X1000)



表五 比較精液異常以精蟲顯微注射術(ICSI)治療和非男性因素試管嬰兒(IVF)治療的病人之臨床結果

	IVF 組	ICSI 組	ICSI 之 OAT 組	ICSI 之 OAT 試驗組
病人數	310	285	55	5
母方年紀	32.5±4.8	33.2±5.0	32.0±4.6	28.2±2.0
不孕期(年)	3.4±2.8	4.2±3.2	5.2±4.0	4.0±1.8
卵泡數	16.3±10.3	12.2±9.1	15.0±9.7	25.6±11.4
採卵數	15.6±10.2	11.4±9.2	14.5±10.0	25.0±11.3
成熟卵數	13.7±9.2	8.8±7.6	11.5±7.7	19.6±10.2
植入數	5.2±2.5	3.9±2.2	4.3±2.2	5.4±1.9
懷孕率(%)	57.2	44.2	50	80.0
受精率(%)	85.5*	73.8	67.1*	68.4
胚胎分裂率(%)	95.3	90.1	90.0	77.8

*非男性因素試管嬰兒(IVF)治療組和精液異常(OAT)以精蟲顯微注射術(ICSI)治療組之受精率比較有明顯差異($p < 0.05$; Chi-square test)

討 論

精蟲品質與卵子活化

因為精蟲顯微注射術治療男不孕症之結果有很好的受精率與懷孕率，故已被廣泛應用(Palermo *et al.*, 1995)。即使精蟲嚴重異常之病患在臨床上亦有不錯之結果。但是透過精蟲顯微注射術精蟲如何活化卵子則須特別注意。哺乳動物的精蟲如何活化卵子至今仍有爭議，有一些學者相信接受體和接受子(ligand-receptor)在配子細胞膜上之交互作用引發卵子激活(Schultz and Kopf, 1995)，另外一些學者認為精蟲含有某些蛋白質進入卵子中引發卵子激活(Swann and Lai, 1997)。精蟲顯微注射術省略了配子細胞膜上之交互作用，因此精蟲顯微注射後卵子激活可能源自於非細胞膜因子或精蟲釋放的因子(Yanagimachi, 1997)。從生理上來看，人類精蟲內引發卵子激活的因子存在於精細胞(spermatids)和精蟲，而不存在於精原細胞 (spermatocytes) (Sousa *et al.*, 1996)，在精蟲生成異常的病例中，引發卵子激活的因子也許不足。因為 Dozortsev 等人於 1994 年曾報告在施行精蟲顯微注射術後沒有受精的卵子有百分之五十一的精核染色體碎列成片段，很可能源自於精核萎縮退化，故精蟲去氧核糖核酸品質對受精成功與否非常重要。

精蟲品質與去氧核糖核酸片段化

精蟲去氧核糖核酸片段化是細胞凋亡的指標，且在不孕男性精蟲中發現明顯偏高(Baccetti *et al.*, 1996)。因此認為，精蟲去氧核糖核酸品質不良可能是造成男性不孕的主因之一(Hughes *et al.*, 1996)。本試驗發現，精蟲異常病患之精蟲去

氧核醣核酸片段化發生率為 18.8% , 顯著高於精蟲正常者 (2.8%)。此結果和先前報導指出的不孕男性之精蟲比可自然受孕男性之精蟲含有更高比例之去氧核醣核酸片段化是一致的(Sun *et al.*, 1997; Lopes *et al.*, 1998)。Evenson *et al.*(1999) 曾在 18 對流產病人中發現 , 有 7 對的精蟲去氧核醣核酸片段化發生率偏高 , 甚至在試管嬰兒治療者中 , 以傳統精液分析正常的不明原因不孕病人中 , 發現有精蟲去氧核醣核酸斷裂的情形(Høst *et al.*, 1999)。

本試驗亦統計 55 個精液異常病人個案之臨床結果 , 發現其施行精蟲顯微注射術療程之受精率為 67.1% , 明顯低於非男性因素試管嬰兒治療者之受精率(85.5%)。而先前亦有學者指出 , 精蟲去氧核醣核酸片段化程度和試管嬰兒及精蟲顯微注射術療程之受精率呈現負相關(Sun *et al.*,1997; Lopes *et al.*, 1998) , 精蟲去氧核醣核酸片段化程度越高 , 越不容易受孕(Manicardi *et al.*,1995, 1998; Bianchi *et al.*, 1996; Sakkas *et al.*, 1996)。

精蟲不規則的去氧核醣核酸斷裂 , 可能是精原細胞在精蟲生成過程中 , 進入細胞死亡的類細胞凋亡程序(Gorczyca *et al.*, 1992, 1993a,b; Baccetti *et al.*, 1996; Darzynkiewicz *et al.*, 1997)。此現象被認為和細胞表面蛋白 Fas 有關(Lee *et al.*,1997) , Fas 是和細胞凋亡相關的第一型膜蛋白(Suda *et al.*, 1993; Krammer *et al.*, 1994; Sakkas *et al.*, 1999a) , 將 Fas 結合位(ligand)結合 Fas 或加入攔抗抗 Fas 抗體(anti-Fas antibody) 於 Fas 細胞表面蛋白 , 細胞會進行細胞凋亡程序而死亡(Suda *et al.*, 1993)。在不孕男性精蟲中發現有 Fas 增加現象 , 尤其是精蟲稀少病人(Sakkas *et al.*,1999b)有 50%的精蟲表現大量

的 Fas，這個結果可能顯示這些細胞被預選為準備進行細胞凋亡過程，但細胞凋亡活化錯誤使精蟲存活並達到射精階段，此現象稱為細胞凋亡失敗(abortive apoptosis)(Sakkas *et al.*, 1999b)。細胞凋亡失敗可能起因於細胞凋亡和精蟲生成同步化出現問題，而讓精蟲成熟而不是進行細胞凋亡(Sakkas *et al.*,1999a)，因此可解釋不正常的精液分析參數和高比例的類似細胞凋亡現象的精蟲去氧核醣核酸片段化之相關性。

內核 在精蟲生成過程是扮演修補雙股去氧核醣核酸缺口的角色，因此精蟲去氧核醣核酸片段化的發生也可能是內生性內核 活性不全造成的(McPherson and Longo, 1992)，精蟲的染色質包裝過程啟動內核 活性以促進魚精蛋白嵌入(protamination)(McPherson and Longo, 1992, 1993a,b)；因此在精細胞階段，內生性內核 活化失敗或修補雙股去氧核醣核酸缺口錯誤，會使細胞啟動細胞凋亡(Sakkas *et al.*,1999a)，內生性精蟲去氧核醣核酸缺口也可能代表精蟲生成過程中成熟不全。

施行精蟲顯微注射術可能使用到活動性差和形態異常之精蟲，因此檢測精蟲去氧核醣核酸完整性就非常重要；本試驗所用的 TUNEL 方法可檢測由細胞凋亡引起的雙股去氧核醣核酸缺口，但由細胞壞死、離子射線或去氧核醣核酸拓樸異構 抑制劑所引起的去氧核醣核酸缺口則不被檢測到，因此可加以分別(Gorczyca *et al.*, 1993a,b)，而且 TUNEL 方法會專一的檢測雙股去氧核醣核酸缺口，而不會檢測到單股去氧核醣核酸缺口(Didier *et al.*,1996; Sakaki *et al.*, 1997; Shinoda *et al.*, 1998)。由本試驗結果推論，施行精蟲顯微注射術所選取的精子群可能會含有相對較高的精蟲去氧核醣核

酸片段化比例，雖然選取去氧核糖核酸片段化的精蟲施行精蟲顯微注射術的結果無法確切知道，但是在臨床上有些受精失敗的卵子，可能和精蟲去氧核糖核酸片段化有關。

最近亦有報告指出，在施行精蟲顯微注射術後受精失敗的卵子中，分別含有 10% 緻密化和 71% 解緻密化的精蟲頭部 (Flaherty *et al.*, 1995)；精蟲染色質異常會影響精蟲顯微注射術後精蟲頭部解緻密化結果 (Sakkas *et al.*, 1996)，當然，卵子本身細胞質異常也會影響雙原核形成。

目前還不清楚精蟲去氧核糖核酸片段化發生的原因，像過氧化氫或超氧化陰離子之類的過氧化物 (reactive oxygen species; ROS) 會導致體細胞的去氧核糖核酸片段化 (Buttke *et al.*, 1994; Ratan *et al.*, 1994)，輸精管靜脈曲張和感染膿精症 (pyospermia) 皆會使活性氧化物增加 (Lenzi *et al.*, 1994)，而且活性氧化物增加會減低魚精蛋白嵌入染色體 (Bianchi *et al.*, 1993; Tejada *et al.*, 1984; Foresta *et al.*, 1992)，這可能和精液品質不佳及去氧核糖核酸片段化有關。使用過氧化物之捕獲物 (scavenger) 去處理精蟲，在體內 (Lenzi *et al.*, 1993) 和體外 (Griveau *et al.*, 1994) 的試驗都證實對精液分析參數有正面效應，再進一步的試驗將會是測量精液中的活性氧化物，並分析其存在濃度和精蟲去氧核糖核酸片段化是否有關。造成精蟲去氧核糖核酸片段化也可能和暴露於有毒環境有關，工業化學污染和精液品質下降之間的關係一直被熱烈討論，有報導指出抽菸者精蟲去氧核糖核酸片段化情形較非抽菸者嚴重 (Sun *et al.*, 1997)，此結果可能可以解釋精蟲去氧核糖核酸片段化和暴露於有毒環境的影響。

精液品質與精液製備技術

本論文所使用的 Percoll 梯度離心法之精液製備技術，先前被證實會改善精蟲去氧核糖核酸品質(Colleu *et al.*, 1996; Golan *et al.*, 1997; Angelopoulos *et al.*, 1998; Larson *et al.*, 1999; Sakkas *et al.*, 2000)，在臨床上已被廣泛應用。Donnelly *et al.*(2000)就曾發表以 Percoll 梯度離心法(95.0~47.5%)分離精蟲，結果發現精蟲去氧核糖核酸品質確實有明顯提高。如果以更多層 Percoll 梯度離心法去分離精蟲，對精蟲去氧核糖核酸品質不佳的病人，也許會有幫助。

精液品質與粒腺體功能缺陷

另一個細胞凋亡的前兆為粒腺體膜電位改變，本試驗發現精蟲異常病患亦有較高之精蟲粒線體功能缺陷，其發生率為 24.9%，而精液正常組只有 5.7% 發生率。且此缺陷比去氧核糖核酸片段化的發生率高，因此，細胞凋亡引起的粒腺體膜電位改變之發生可能早於細胞凋亡引起的去氧核糖核酸片段化。Apoalert™ Mitochondrial Membrane Sensor Kit 所含的 5,5',6,6' -tetrachloro-1,1',3,3' -tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodide (JC-1)，在粒腺體膜電位改變之評估是很可靠的(Salvioli *et al.*, 1997)，此螢光探針在識別粒腺體膜電位高低的能力，能精確評估粒腺體代謝功能(Garner *et al.*, 1997; Salvioli *et al.*, 1997)。精蟲粒腺體存在中節部位，主要和精蟲運動的能量提供有關，因此，細胞凋亡引起的粒腺體膜電位改變，影響精蟲活動力應該最明顯。而精蟲活動力會直接影響受精率，因此，粒腺體膜電位改變應該會影響受精率。

精液品質與精蟲染色體倍數異常

從 1994 年報導透過螢光原位雜交法(FISH)分析精蟲染色體倍數(Miharu *et al.*, 1994)後，關於不孕症男性和精蟲異常病患之精蟲染色體倍數異常也陸續被報導，包括第 13, 18, 21 對染色體及性染色體 X 和 Y(Miharu *et al.*, 1994; Moosani *et al.*, 1995; Pang *et al.*, 1995, 1999; Bernardini *et al.*, 1997; Colombero *et al.*, 1997)，還有第 1 及 7 對染色體(Lähdetie *et al.*, 1997)。在不孕症男性和正常可受孕男性之精蟲染色體倍數異常率之差別上，有些學者認為有差別(Pang *et al.*, 1995)，有的則發現沒有顯著差別(Miharu *et al.*, 1994)。Storeng 比較試管嬰兒和精蟲顯微注射術病人之精蟲，發現後者性染色體倍數異常率明顯較高(Storeng *et al.*, 1998)，和本篇試驗證實的精蟲異常病患有較高之精蟲染色體倍數異常發生率(0.12%)結果相吻合，Aran 等人亦認為精蟲異常病患有較高之精蟲染色體倍數異常發生率，尤其是性染色體異常(Aran *et al.*, 1999; Pang *et al.*, 1999; Pfeifer *et al.*, 1999; Bernardini, 2000; Nishikawa *et al.*, 2000; Ushijima *et al.*, 2000; Vegetti *et al.*, 2000)。另一方面，精蟲數目稀少之男性被調查發現有較高之染色體互換平衡轉位(reciprocally balanced translocation)發生率(Baschat *et al.*, 1996)，而在無精症男性中，染色體異常率約為 15%，精蟲數目稀少之男性染色體異常率則介於 6~7%(Bourrouillou *et al.*, 1992)，即使染色體正常之男性亦排除不了製造出染色體異常之精蟲(Rudak *et al.*, 1978; Martin *et al.*, 1987; Han *et al.*, 1993; Holmes and Martin, 1993)。

精蟲染色體倍數異常，對臨床施行精蟲顯微注射術結果

之影響是值得注意的，有報告指出在分析十個精蟲嚴重異常病患中，總共施行精蟲顯微注射術十一回合，發現精蟲染色體倍數異常率偏高，平均受精率為 70%，只有兩位病患成功懷孕(Pfeiffer *et al.*, 1999)，另一個報告指出，在分析九個精蟲嚴重異常病患中，總共施行精蟲顯微注射術五回合，發現精蟲倍數異常率為 33-74%(Pang *et al.*, 1999)，沒有病患成功懷孕。

胚胎品質與染色體倍數異常

本試驗亦在施行精蟲顯微注射術之後，以螢光原位雜交法分析八個生長停滯胚胎，結果發現兩個胚胎染色體倍數正常，另外六個有混合正常與異常染色體倍數的細胞，即所謂的 mosaic, 此現象在人類分裂階段的胚胎很常見(Munne *et al.*, 1994, Delhanty *et al.*, 1997)。先前有報告指出施行精蟲顯微注射術著床失敗者有精蟲染色體倍數異常率偏高現象(Rubio *et al.*, 2001)，且有較差之胚胎品質。此結果和精液品質不良有關(Pellestor, 1991)，精液品質不良曾被提出會影響胚胎染色體結構，卵子雖然可被染色體異常精蟲受精，但最後會導致著床失敗(In't Veld *et al.*, 1997; Pang *et al.*, 1999)，而且胚胎分裂的中心體是由父系因子來的，如果精蟲品質不良，很可能會致使胚胎染色體結構異常(Obasaju *et al.*, 1999)。另一方面，大約有 60% 懷孕前三個月的自然流產是由配子生成 (gametogenesis) 過程中染色體脫離(disjunction) 失敗引起的，雖然此現象大部分由母系來的，但在分子層面之研究曾發現有 8~12% 染色體 13, 18 和 21 三倍體造成的流產是由父系來的(Nicolaidis and Petersen, 1998)。由精蟲螢光原位雜交法分

析亦發現，精蟲性染色體雙倍異常率和習慣性流產之間有正相關(Rubio *et al.*, 1999)。施行精蟲顯微注射術之後懷孕的胎兒中染色體異常率介於 1%~40% 之間(Govaerts *et al.*, 1995; In't Veld *et al.*, 1995; Liebaers *et al.*, 1995)。而且此性染色體異常被認為可能源自父系(Van Opstal *et al.*, 1997)。

結論

本試驗的結論為精蟲異常病患者有較高之精蟲去氧核醣核酸片段化發生率(18.8%)，粒線體功能缺陷發生率(24.9%)與染色體倍數異常發生率(0.12%)，且其受精率(67.1%)亦比非男性因素試管嬰兒(IVF)治療的病人之受精率(85.5%)低。因此在施行精蟲顯微注射術之前，遺傳諮詢及如何篩選品質優良精蟲就成為重要課題。基本上，細胞凋亡是一種保護機制，在精液射出後，有一些不良精蟲可能還沒完成細胞凋亡程序，而且健康精蟲和進行細胞凋亡中的精蟲，在外觀上並無法辨識，如果將精蟲體外培養一陣子，使細胞凋亡程序完成，也許有助於分離健康精蟲以作為精蟲顯射術之精蟲來源。如果說精蟲進行細胞凋亡和自由基的攻擊有關，那麼在臨床上給病患補充抗氧化劑，或在精液製備過程添加抗氧化劑，或許有幫助。進一步改善精液製備技術，例如增加 Percoll 梯度離心的密度層次，也許對於精蟲嚴重品質不佳的病人，會有所改善。

參考文獻

1. **Angelopoulos T, Moshel YA, Lu L *et al.*** (1998) Simultaneous assessment of sperm chromatin condensation and morphology before and after separation procedures: effect on the clinical outcome after *in vitro* fertilization. *Fertil Steril*, **69**, 740-747.
2. **Aran B, Blanco J, Vidal F *et al.*** (1999) Screening for abnormalities of chromosomes X, Y, and 18 and for diploidy in spermatozoa from infertile men participating in an in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection program. *Fertil Steril*, **72**, 696-701.
3. **Arends MJ and Wyllie AH.** (1991) Apoptosis: mechanisms and role in pathology. *Int Rev Exp Pathol*, **32**, 223-254.
4. **Arends MJ, Morris RG and Wyllie AH.** (1990) Apoptosis- the role of the endonuclease. *Am J Pathol*, **136**, 593-608.
5. **Baccetti B, Collodel G and Piomboni P.** (1996) Apoptosis in human ejaculated sperm cells. *J Submicrosc Cytol Pathol*, **28**, 587-596.
6. **Baschat AA, Kupker W, al Hasani S *et al.*** (1996) Results of cytogenetic analysis in men with severe subfertility prior to intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, **11**, 330-333.
7. **Ben-Chetrit A, Senoz S, Greenblatt EM, Casper RF.** (1995) *In vitro* fertilization outcome in the presence of severe male factor infertility. *Fertil Steril*, **63**, 1032-1037.

8. **Bernardini L, Martini E, Geraedts JPM et al.** (1997) Comparison of gonosomal aneuploidy in spermatozoa of normal fertile men and those with severe male factor detected by *in situ* hybridization. *Mol Hum Reprod*, **3**, 431-438.
9. **Bernardini L, Gianaroli L, Fortini D et al.** (2000) Frequency of hyperhypohaploidy and diploidy in ejaculate, epididymal, and testicular germ cells of infertile patients. *Hum Reprod*, **15**, 2165-2171.
10. **Bianchi PG, Manicardi D, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D.** (1993) Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and *in situ* nick-translation of murine and human spermatozoa. *Biol Reprod*, **49**, 1083-1088.
11. **Boise LH, Gonzales-Garcia M, Postema CE et al.** (1993) BclX, a Bcl2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*, **74**, 597-608.
12. **Bonduelle M, Aytoz A, Van Assche E et al.** (1998) Incidence of chromosomal aberrations in children born after assisted reproduction through intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, **13**, 781-782.
13. **Bourrouillou G, Bujan L and Calvas P.** (1992) Role and contribution of karyotyping in male infertility. *Prog Urol*, **2**, 189-195.
14. **Buttke TM, Sandstrom PA.** (1994) Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today*, **15**, 7-10.
15. **Casper RF, Meriano J, Jarvi K, Cowan L, Lucato M.**

- (1996) The hypo-osmotic swelling test for selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection in men with complete asthenozoospermia. *Fertil Steril*, **65**, 972-976.
16. **Coddington CC, Oehninger SC, Olive DL et al.** (1994) Hemizona index(HZI) demonstrates excellent predictability when evaluate sperm fertilizing capacity in *in vitro* fertilization patients. *J Androl*, **15**, 250-254.
17. **Colleu D, Lescoat D and Gouranton J.** (1996) Nuclear maturity of human spermatozoa selected by swim-up or by Percoll gradient centrifugation procedures. *Fertil Steril*, **65**, 160-164.
18. **Colombero LT, Hariprashad J, Moy F et al.** (1997) Impact of abnormal semen parameters on the genetic status of human spermatozoa. *J Androl*, *18(Suppl)*, **Abstr 11**, p P-27.
19. **Compton MM.** (1992) A biochemical hallmark of apoptosis – internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metast Rev*, **11**, 105-119.
20. **Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X et al.** (1997) Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry*, **27**, 1-20.
21. **Delhanty JDA, Harper JC, Ao A et al.** (1997) Multicolour FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients. *Hum Genet*, **99**, 755-760.
22. **Didier M, Bursztajn S, Adamec E et al.** (1996) DNA strand breaks induced by sustained glutamate excitotoxicity in

- primary neuronal cultures. *J Neurosci*, **16**, 2238-2250.
23. **Dinsdale D, Zhuang J and Cohen GM.** (1999) Redistribution of cytochrome c precedes the caspase-dependent formation of ultracondensed mitochondria, with a reduced inner membrane potential, in apoptotic monocytes. *Am J Pathol*, **155**, 607-618.
24. **Dozortsev D, De Sutter P and Dhout M.** (1994) Behaviour of spermatozoa in human oocytes displaying no or one pronucleus after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, **9**, 2139-2144.
25. **Earnshaw WC.** (1995) Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 337-343.
26. **Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K et al.** (1999) Utility of the sperm chromatin assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod*, **14**, 1039-1049.
27. **Finucane DM, Bossy-Wetzel E, Waterhouse NJ et al.** (1999) Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *J Biol. Chem*, **274**, 2225-2233.
28. **Flaherty SP, Payne D, Swann NJ, Matthews CD.** (1995) Assessment of fertilization failure and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reprod Fertil Dev*, **7**, 197-210.
29. **Foresta C, Zorzi M, Rossato M, Barotto A.** (1992) Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal

- persistence of histones in spermatozoa in infertile men. *Int J Androl*, **15**, 330-337.
30. **Frade JM and Michaelidis TM.** (1997) Origin of eukaryotic programmed cell death: a consequence of aerobic metabolism? *Bioessays*, **19**, 827-832.
31. **Gandini L, Lombardo F, Paoli D et al.** (2000) Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod*, **15**, 830-839.
32. **Garner DL, Thomas CA, Joerg HW et al.** (1997) Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod*, **57**, 1401-1406.
33. **Gavrieli Y, Sherman Y, and Ben-Sasson SA.** (1992) Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, **119**, 493-501.
34. **Golan R, Shochat L, Weissenberg R et al.** (1997) Evaluation of chromatin condensation in human spermatozoa: a flow cytometric assay using acridine orange staining. *Mol Hum Reprod*, **3**, 47-54.
35. **Gorczyca W, Bruno S, Darzynkiewicz RJ et al.** (1992) DNA strand breaks occurring during apoptosis – their early *in situ* detection by the terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Int J Oncol*, **1**, 639-648.
36. **Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H and Darzynkiewicz Z.** (1993a) Presence of DNA strand breaks

and increased sensitivity of DNA *in situ* to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res*, **207**, 202-205.

37. **Gorczyca W, Bigman K, Mittelman A et al.** (1993b) Induction of DNA strand breaks associated with apoptosis during treatment of leukaemia. *Leukemia*, **7**, 659-670.
38. **Govaerts I, Englert Y, Vamos E et al.** (1995) Letters to the editor: Sex chromosome abnormalities after intracytoplasmic sperm injection. *Lancet*, **346**, 1095-1096.
39. **Green DR and Reed JC.** (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science*, **281**, 1309-1312.
40. **Griveau JF, LeLannou D.** (1994) Effects of antioxidants on human sperm preparation techniques. *Int J Androl*, **17**, 225-231.
41. **Haines G, Marples B, Daniel P et al.** (1998) DNA damage in human and mouse spermatozoa after in-vitro irradiation assessed by the Comet assay. *Adv Exp Med Biol*, **444**, 79-91.
42. **Han TL, Flaherty SP, Ford JH et al.** (1993) Detection of X- and Y- bearing human spermatozoa after motile sperm isolation by swim up. *Fertil Steril*, **60**, 1046-1051.
43. **Hassold T, Chen N, Funkhouser J et al.** (1980) A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann Hum Genet*, **44**, 151-178.
44. **Holms JM and Martin RH.** (1993) Aneuploidy detection in human sperm nuclei using fluorescence *in situ* hybridization. *Hum Genet*, **91**, 20-24.

45. **Høst E, Lindenberg S, Kahn JA et al.** (1999) DNA strand breaks in human sperm cells: a comparison between men with normal and oligozoospermic sperm samples. *Acta Obstet Gynecol Scand*, **78**, 336-339.
46. **Hughes CM, Lewis SEM, McKelvey MV et al.** (1996) A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified Comet assay. *Mol Hum Reprod*, **2**, 613-619.
47. **In' t Veld PA, Broekmans FJM, de France HF et al.** (1997) Intracytoplasmic sperm injection and abnormal spermatozoa. *Hum Reprod*, **12**, 752-754.
48. **In' t Veld P, Brandenburg H, Verhoeff A, Dhont M, Los F.** (1995) Sex chromosomal abnormalities and intracytoplasmic sperm injection. *Lancet*, **346**, 773.
49. **Irvine S, Twigg JP, Gordon EL et al.** (2000) DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl*, **21**, 33-44.
50. **Jacobson MD, Burne JF, King MP et al.** (1993) Bcl2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature*, **361**, 365-369.
51. **Jaffe T, Oates RD.** (1994) Genetic abnormalities and reproductive failure. *Urol Clin North Am*, **21**, 389-408.
52. **Jeyendran RR, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD.** (1984) Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod*

- Fert*, **70**, 219-218.
53. **Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR.** (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications for tissue kinetics. *Br J Cancer*, **26**, 239-257.
54. **Krammer PH, Behrmann I, Daniel P et al.** (1994) Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr Opin Immunol*, **6**, 279-289.
55. **Kroemer G.** (1997) Mitochondrial implication in apoptosis. Towards an endosymbiont hypothesis of apoptotic evolution. *Cell Death Diffrentn*, **4**, 443-456.
56. **Kruger TF, Ackerman SB, Simmons KF et al.** (1987) A quick, reliable staining technique for sperm morphology. *Arch Androl*, **18**, 275-277.
57. **Lahdetie J, Saari N, Ajosenpoa M et al.** (1997) Incidence of aneuploid spermatozoa among infertile men studied by multicolour fluorescence *in situ* hybridization. *Am J Med Genet*, **71**, 115-121.
58. **Larson KL, Brannian JD, Timm BK et al.** (1999) Density gradient centrifugation and glass wool filtration of semen remove spermatozoa with damaged chromatin structure. *Hum Reprod*, **14**, 2015-2019.
59. **Lee J, Richburg JH, Younkin SC and Boekelheide K.** (1997) The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology*, **138**, 2081-2088.
60. **Lenzi A, Picardo M, Gandini L, Lombardo F, Terminali O, Passi S Dondero F.** (1994) Glutathione treatment of

dyspermia:effect on the lipoperoxidation process. *Hum Reprod*, **9**, 2044-2050.

61. **Lenzi A, Culasso F, Gandini L, Lombardo F, Dondero F.** (1993) Placebo controlled, double blind, cross-over trial of glutathione therapy in male infertility. *Hum Reprod*, **8**, 1657-1662.
62. **Liebaers I, Bonduelle M, Van Assche E et al.** (1995) Sex chromosome abnormalities after intracytoplasmic sperm injection. *Lancet*, **346**, 1095.
63. **Li P, Nijhawan D, Budihardjo I et al.** (1997) Cytochrome c and dATP dependent formation of Apaff-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, **91**, 479-489.
64. **Liu X, Kim CN, Yang J et al.** (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirements for dATP and cytochrome c. *Cell*, **86**, 147-157.
65. **Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF.** (1998) Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, **69**, 528-532.
66. **Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S et al.** (1995) Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to Chronomycin A3 accessibility. *Biol Reprod*, **52**, 864-867.
67. **Manicardi GC, Tombacco A, Bizzaro D et al.** (1998) DNA

- strand breaks in ejaculated human spermatozoa: comparison of susceptibility to the nick translation and terminal transferase assays. *Histochem J*, **30**, 33-39.
68. **Martin RH, Lin CC, Balkman W *et al.*** (1982) Direct chromosomal analysis of human spermatozoa: preliminary results from 18 normal men. *Am J Hum Genet*, **34**, 459-468.
69. **Martin RH, Rademaker AW, Hildebrand K *et al.*** (1987) Variation in the frequency of sperm chromosomal abnormalities among normal men. *Hum Genet*, **77**, 108-114.
70. **Martin RH, Spriggs E and Rademaker AW.** (1996) Multicolor fluorescence *in situ* hybridization analysis of aneuploidy and diploidy frequencies in 225846 sperm from 10 normal men. *Biol Reprod*, **54**, 394-398.
71. **Martin SJ, Reutelingsperger CPM, McGahon AJ *et al.*** (1995) Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*, **182**, 1545-1556.
72. **McPherson SMG and Longo FJ.** (1992) Localization of Dnase I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. *Mol Reprod Dev*, **31**, 268-279.
73. **McPherson SMG and Longo FJ.** (1993a) Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of

- DNA topoisomerase II. *Dve Biol*, **158**, 122-130.
74. **McPherson SMG and Longo FJ.** (1993b) Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatides. *Eur J Histol*, **37**, 109-128.
75. **Miharu N, Best RG and Young SR.** (1994) Numerical chromosome abnormalities in spermatozoa of fertile and infertile men detected by fluorescence *in situ* hybridization. *Hum Genet*, **93**, 502-506.
76. **Moosani N, Pattinson HA, Carter MD et al.** (1995) Chromosomal analysis of sperm from men with idiopathic infertility using sperm karyotyping and fluorescence *in situ* hybridization. *Fertil Steril*, **64**, 811-817.
77. **Munne S, Weier HUG, Grifo J et al.** (1994) Chromosome mosaicism in human embryos. *Biol Reprod*, **51**, 373-379.
78. **Nicolaidis P and Petersen MB.** (1998) Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. *Hum Reprod*, **13**, 313-319.
79. **Nishikawa N, Murakami I, Ikuta K et al.** (2000) Sex chromosomal analysis of spermatozoa from infertile men using fluorescence *in situ* hybridization. *J Assist Reprod Genet*, **17**, 97-102.
80. **Nishikawa S and Sasaki F.** (1995) DNA localization in nuclear fragments of apoptotic ameloblasts using anti-DNA immunoelectron microscopy—programmed cell death of ameloblasts. *Histochem Cell Biol*, **104**, 151-159.

81. **Oates RD, Amos JA.** (1994) The genetic basis of congenital bilateral absence of the vas deferens and cystic fibrosis. *J Androl* , **15**, 1-8.
82. **Obasaju M, Kadam A, Sultan K et al.** (1999) Sperm quality may adversely affect the chromosome constitution of embryos that result from intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, **72**, 1113-1115.
83. **Oltvai ZN, Milliman CL and Korsmeyer SJ** (1993) Bcl2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog Bax that accelerates programmed cell death. *Cell*, **74**, 609-619.
84. **Palermo G, Cohen J, Alikani M, Adler A, Rosenwaks Z.** (1995) Development and implementation of intracytoplasmic sperm injection(ICSI). *Reprod Fertil Dev*, **7**, 221-218.
85. **Pang MG, Hoegerman SF, Cuticchia AJ et al.** (1999) Detection of aneuploidy for chromosomes, 4,6,7,8,9,10,11,12,13,17,18,21, X and Y by fluorescence in-situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenoteratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, **14**, 1266-1273.
86. **Pang MG, Zackowski JL, Hoegerman SF et al.** (1995) Detection by fluorescence *in situ* hybridization of chromosomes 7, 11, 12, 18, X and Y abnormalities in sperm from oligoasthenoteratozoospermic patients of an *in vitro* fertilization program. *J Assist Reprod Genet*, **12(suppl)**, Abstr OC-105, p53S.
87. **Patrizio P, Asch RH, Handelin B, Silber SJ.** (1993)

- Aetiology of congenital absence of vas deferens: genetic study of three generations. *Hum Reprod*, **8**, 215-220.
88. **Pellestor F.** (1991) Differential distribution of aneuploidy in human gametes according to their sex. *Hum Reprod*, **6**, 1252-1258.
89. **Pentikainen V, Erkkila and Dunkel L.** (1999) Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis *in vitro*. *Endocrinol Metab*, **39**, E310-E316.
90. **Petit PX, Susin S-A, Zamzami N et al.** (1996) Mitochondria and programmed cell death: back to the future. *FEBS Lett*, **396**, 7-13.
91. **Pfeiffer J, Pang MG, Hoegerman SF et al.** (1999) Aneuploidy frequencies in semen fractions from ten oligoasthenoteratozoospermic patients donating sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, **72**, 472-478.
92. **Ratan PR, Murphy TH, Baraban JM.** (1994) Oxidative stress induces apoptosis in embryonic cortical neurons. *J Neurochem*, **62**, 376-379.
93. **Rawe VY, Brugo Olmedo S, Nodar FN et al.** (2000) Cytoskeletal organization defects and abortive activation in human oocytes after IVF and ICSI failure. *Mol Hum Reprod*, **6**, 510-516.
94. **Rudak E, Jacobs PA and Yanagimachi R.** (1978) Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature*, **274**, 911-913.
95. **Rubio C, Gil-Salóm M, Simon C, Vidal F, Rogrigo L,**

- Minguez Y, Remohi and Pellicer A.** (2001) Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population:relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod*, **16**, 2084-2092.
- 96.**Rubio C, Simón C, Blanco J et al.** (1999) Implications of sperm chromosome abnormalities in recurrent miscarriage. *J Assist Reprod Genet*, **16**, 253-258.
- 97.**Rudak E, Jacobs PA and Yanagimachi R.** (1978) Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature*, **274**,911-913.
- 98.**Sakaki T, Kohmura E, Kishiguchi T et al.** (1997) Loss and apoptosis of smooth muscle cells in intra-cranial aneurysms. Studies with *in situ* DNA labeling and antibody against single-stranded DNA. *Acta Neurochir.(Wien)*, **139**, 469-475.
- 99.**Sakkas D, Manicardi GC Bianchi PG et al.** (1995) Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa. *Biol Reprod*, **52**, 1149-1155,
100. **Sakkas D, Urner F, Bizzaro D et al.** (1996) Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Hum Reprod*, **11**, 837-843.
101. **Sakkas D, Mariethoz E and John JC.** (1999a) Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res*, **251**, 350-355.

102. **Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi GC et al.** (1999b)
Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa.
Rev Reprod, **4**, 31-37.
103. **Sakkas D, Manicardi GC, Tomlinson M et al.** (2000)
The use of two density gradient centrifugation techniques
and the swim-up method to separate spermatozoa with
chromatin and nuclear DNA anomalies. *Hum Reprod*, **15**,
1112-1116.
104. **Salvioli S, Ardizzoni A, Franceschi C and Cossarizza**
A. (1997) JC-1, but not DiOC₆(3) or rhodamine 123 is a
reliable fluorescent probe to assess mitochondrial membrane
potential changes in intact cells: implication for studies on
mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Lett*, **411**,
77-82.
105. **Simerly C, Wu G, Zoran S et al.** (1995) The paternal
inheritance of the centrosome, the cell's
microtubule-organizing center, in humans, and the
implications for infertility. *Nature Medicine*, **1**, 47-52.
106. **Sharma RK, Pasqualotto FF Nelson DR et al.** (1999)
The reactive oxygen species- total antioxidant capacity score
is a new measure of oxidative stress to predict male infertility.
Hum Reprod, **14**, 2801-2807.
107. **Shinoda K, Mitsumori K, Yashuhara K et al.** (1998)
Involvement of apoptosis in the rat germ cell degradation
induced by nitrobenzene. *Archs Toxicol*, **72**, 296-302.
108. **Sousa M, Mendoza C, Barros A et al.** (1996) Calcium

- responses of human oocytes after intracytoplasmic injection of leukocytes, spermatocytes and round spermatids. *Mol Hum Reprod*, **2**, 853-857.
109. **Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Letter G et al.** (2000) Sperm chromatin damage impairs human fertility. *Fertil Steril*, **73**, 43-50.
110. **Storeng RT, Plachot M, Theophile D et al.** (1998) Incidence of sex chromosome abnormalities in spermatozoa from patients entering an IVF or ICSI protocol. *Acta Obstet Gynecol Scand*, **77**, 191-197.
111. **Suda T, Takahashi T, Golstei P and Nagata S.** (1993) Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumour necrosis factor family. *Cell*, **75**, 1169-1178.
112. **Sun JG, Jurisicova A and Casper R.** (1997) Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization *in vitro*. *Biol Reprod*, **56**, 602-607.
113. **Swann K and Lai FA.** (1997) A novel signalling mechanism for generating Ca^{2+} oscillations at fertilization in mammals. *Bioessays*, **19**, 371-378.
114. **Tateno H, Kamiguchi Y, Watanabe S et al.** (1996) Relative biological effectiveness (RBE) of ^{252}Cf fission neutrons for the induction of chromosome damage in human spermatozoa. *Int J Radiat Biol*, **70**, 229-235.
115. **Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ,**

- Friedman S.** (1984) A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (OA) fluorescence. *Fertil Steril*, **42**, 87-91.
116. **Tesarik J, Greco E, Cohen-Bacrie P et al.** (1998) Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. *Mol Hum Reprod*, **4**, 757-762.
117. **Twigg JP, Irvine DS, and Aitken RJ.** (1998) Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, **13**, 1864-1871.
118. **Ushijima C, Kumasako Y, Kihale PE et al.** (2000) Analysis of chromosomal abnormalities in human spermatozoa using multi-colour fluorescence *in situ* hybridization. *Hum Reprod*, **15**, 1107- 1111.
119. **Vegetti W, Van Assche E, Frias A et al.** (2000) Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence *in situ* hybridisation in infertile men. *Hum Reprod*, **15**, 351-365.
120. **Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R et al.** (1993) A new method to detect apoptosis in paraffin sections—*in situ* end labeling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem*, **41**, 7-12.
121. **Williams BJ, Ballenger CA and Malter HE.** (1993) Non-disjunction in human sperm: results of fluorescence *in situ* hybridization studies using two and three probes. *Hum Mol Genet*, **2**, 1929-1936.

122. **Van Opstal D, Los FJ, Ramlakhan S et al.** (1997) Determination of the parent of origin in nine cases of prenatally detected chromosome aberrations found after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, **12**, 682-686.
123. **Williams GT.** (1991) Programmed cell death–apoptosis and oncogenesis. *Cell*, **65**, 1097-1098.
124. **Williams GT and Smith CA.** (1993) Molecular regulation of apoptosis–genetic controls on cell death. *Cell*, **74**, 777-779.
125. **World Health Organization.** (1999) Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th edn. Press Syndicate of the University of Cambridge. Cambridge.
126. **Wyllie AH, Kerr JFR and Currie AR.** (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, **68**, 251-300.
127. **Yanagida K, Katayose H, Hoshi K et al.** (1997) Effect of electrical stimulation on oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *J Mamm Ova Res*, **14**, 132-138.
128. **Yanagida K, Yazawa H, Katayose H et al.** (1998) Influence of oocyte preincubation time on fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, **13**, 2223-2226.
129. **Yin Y, Stahl BC, DeWolf WC et al.** (1998) Heat-induced testicular apoptosis occurs independently of

- hormonal depletion. *Apoptosis*, **3**, 281-287.
130. **Zhuang J, Ren Y, Snowden RT et al.** (1998a)
Dissociation of phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis from other features of the apoptotic program. *J Biol Chem*, **273**, 15628-15632.
131. **Zhuang J, Dinsdale D and Cohen GM.** (1998b)
Apoptosis, in human monocytic THP.1 cells, results in the release of cytochrome c from mitochondria prior to their ultracondensation, formation of outer membrane discontinuities and reduction in inner membrane potential. *Cell Death Differntn*, **5**, 953-962.

附錄一

試管嬰兒懷孕及分娩 2612 名新生兒之結果分析----2201 案例

研究目的: 本篇研究為評估經試管嬰兒療程而成功懷孕分娩的結果。

研究方法: 本研究收集李茂盛醫師近十四年來治療試管嬰兒案例，從 1986 年 1 月進行至 1999 年 6 月所進行試管嬰兒療程之個案，於臨床證實懷孕後即列入追蹤訪視，這些個案生產的結果經由調閱病歷紀錄或由諮詢人員訪查，所用的調查方法有當面訪問，電話聯繫或郵寄問卷，而調查的內容包括懷孕時的健康情況、分娩週數、新生兒性別、體重、健康狀況等。在本中心這十四年一共有 2201 個療程懷孕，懷孕期間的流產率、子宮外孕比例、多胞胎率及新生兒體重等皆予以統計分析。

研究結果: 在 2201 個懷孕成功的療程中，有 1757 位活產 (80%)，多胞胎佔活產數的 42.7%(750/1757)，其中 664 個療程為雙胞胎，67 個療程為三胞胎，19 個療程為四胞胎。懷孕個案中子宮外孕佔 2.3%(51/2201)，流產率佔 17%(375/2201)。有 438 名產婦採自然分娩，其餘 1319 名產婦則以剖腹生產，總共有 2612 名新生兒誕生，其中男嬰佔 54.6%(1427/2612)，女嬰佔 45.4%(1185/2612)全部新生兒平均體重為 2450±470 公克。

結論: 本篇報告分析試管嬰兒療程的結果，並追蹤至分娩後的新生兒健康情形，以提供從事試管嬰兒療程分娩後新生兒的健康情形的參考。

附錄二

以精蟲顯微注射治療 2196 個男性不孕症療程之結果分析

研究目的: 本研究收集李茂盛婦產科診所 1995 年 9 月至 1999 年 6 月期間以精蟲顯微注射人類卵子以治療男性不孕症的病例，統計並評估經由此療程懷孕至分娩之結果。

材料及方法: 1995 年 9 月至 1999 年 6 月本院共有 2196 個需進行試管嬰兒並輔以精蟲顯微注射療程的個案，這些個案的體外受精我們以精蟲直接注入卵母細胞質的方式強迫受精，其餘的治療方式則與一般的試管嬰兒治療過程一樣，於臨床證實懷孕後即列入追蹤訪視，這些個案生產的結果經由調閱病歷紀錄或由諮詢人員訪查，而調查的內容包括懷孕時的健康情況、分娩週數、新生兒性別、體重、健康狀況等，再予以統計分析。

研究結果: 根據統計結果，1995 年 9 月至 1999 年 6 月經由試管嬰兒並輔以精蟲顯微注射療程的個案懷孕率為百分之三十一點六 (646/ 2039), 在 646 個懷孕成功的療程中，有 508 位活產(78.6%)，多胞胎佔活產數的 34%(173/508)，懷孕個案中子宮外孕佔 1.2% (8/646)，流產率佔 18.1%(117/646)。男嬰佔 50.9%(348/684)，平均體重為 2691 公克，女嬰佔 49.1%(336/684)，平均體重為 2597 公克，新生兒平均體重為 2645 公克。

結論: 精蟲顯微注射是治療重度男性不孕症相當有效的技術，此技術可以安全的輔助精卵受孕，而以此技術順利分娩管嬰兒與一般試管嬰兒的結果並沒有差異，因此可以安心將此技術應用於精蟲穿透力低，精蟲極少或異常的患者以輔助精卵受孕。

附錄三

精蟲顯微注射術產生之男嬰與其不孕父親之 Y 染色體缺損遺傳之可能性

研究目的:調查 Y 染色體缺損與染色體異常在無精症或嚴重精蟲稀少症患者之發生率, 以及透過精蟲顯微注射術產生之男嬰是否遺傳父親之 Y 染色體缺損。

材料及方法: 非阻塞性無精症或嚴重精蟲稀少症患者(精蟲數 $<10 \times 10^6/\text{ml}$) 以及透過精蟲顯微注射術產生之男嬰之血液樣本作染色體分析(karyotyping)和 AZF 區 Y 染色體缺損之聚合連鎖反應(polymerase chain reaction)。

研究結果:

表一 無精症或嚴重精蟲稀少症患者染色體異常率與 Y 染色體缺損發生率

病人數	病因	精蟲數	染色體異常率	Y 染色體缺損發生率
36	無精症	0	10.7%(3/28)	13.9%(5/36)
19	嚴重精蟲稀少症	$<10 \times 10^6/\text{ml}$	6.7%(1/15)	15.8%(3/19)

表二 精蟲顯微注射術產生之男嬰遺傳其父親之 Y 染色體缺損

父子對	父親病因	父親染色體異常率	父親 Y 染色體缺損發生率	男嬰 Y 染色體缺損發生率
9	無精症	0%(0/9)	11.1%(1/9)	22.2%(2/9)

結論: 男不孕症患者診斷 Y 染色體缺損與染色體異常可確認病因給於適當治療, 透過精蟲顯微注射術產生之男嬰會遺傳父親之 Y 染色體缺損, 故在施術前需作遺傳諮詢。

附錄四

Y 染色體微缺損之病患施行精蟲顯微注射術後之結果

研究目的:調查 Y 染色體缺損之病患施行精蟲顯微注射術之臨床結果。

研究方法: 具有 Y 染色體缺損之非阻塞性無精症或嚴重精蟲稀少症患者(精蟲數 $<10 \times 10^6$ /ml)在施行精蟲顯微注射術後之受精率, 胚胎植入數, 懷孕率與著床率之結果。

研究結果:

表一 Y 染色體缺損與非 Y 染色體缺損之病人施行精蟲顯微注射術後之結果

	Y 染色體缺損組	控制組
病人數	11	86
精蟲顯微注射術施術次數	7	147
母親年紀	29.7 \pm 13.6	30.9 \pm 11.6
受精率 (%)	67.9 \pm 21.5 (38/56)	70.0 \pm 17.8 (1026/1465)
胚胎植入數	3.9 \pm 2.1(27/7)	4.4 \pm 2.4 (646/147)
懷孕率	42.9 \pm 13.5 (3/7)	39.5 \pm 12.4(58/147)
著床率	18.5 \pm 8.4 (5/27)	20.9 \pm 11.8 (135/646)

結論: 本篇報告分析 Y 染色體缺損與非 Y 染色體缺損之病人施行精蟲顯微注射術後之臨床結果並無差異, Y 染色體缺損之病人依然抱子有望, 但男嬰長大後可能也有不孕的問題。

附錄五

精液分析之計算盤

MAKLER COUNTING CHAMBER

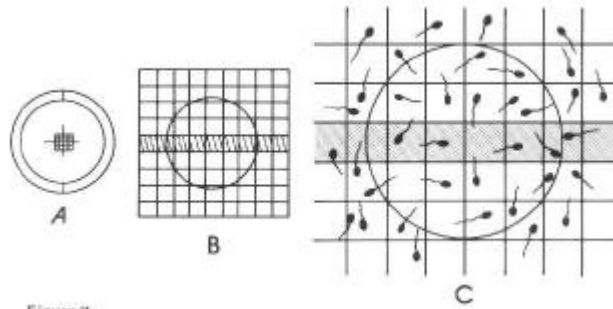
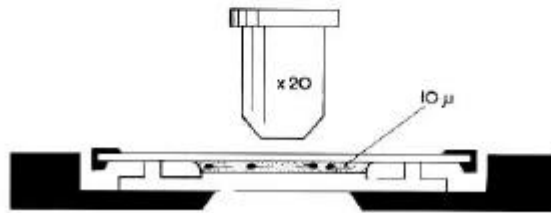
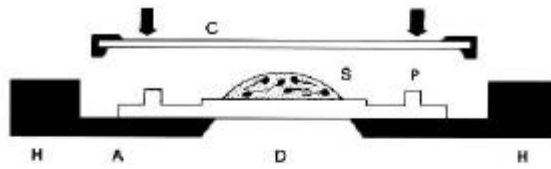


Figure 3.

附錄六

人類輸卵管培養液之配製

1. CaCl ₂ .2H ₂ O	(Sigma; C7902)	0.15g
2. D-Glucose	(Sigma; G7021)	0.253g
3. KCl	(Sigma; P5405)	0.175g
4. KH ₂ PO ₄	(Sigma; P5655)	0.025g
5. MgSO ₄ .7H ₂ O	(Sigma; M2643)	0.012g
6. NaCl	(Sigma; S9888)	2.852g
7. NaHCO ₃	(Sigma; S4019)	1.05g
8. Na pyruvate	(Sigma; P5280)	0.018g
9. Phenol Red	(Merk7241.0025)	0.001g
10. Na Lactate 98% Syrup	(Sigma; L4263)	1.525g
11. EDTA	(Gibco; 60-00-4)	0.021g
12. Glutamine	(Sigma; G1517)	0.075g
13. Penicilline-streptomycin	(Gibco; 15140-031)	5ml

加 ddH₂O 至 500ml